 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.11.19 J South Med Univ, 2015, 35(11): 1614-1618

基础研究

狼毒大戟提取物通过NF-κB通路激活潜伏HIV

潘晓彦[1],张明娇[2],曾晓云[1],林 健[1],李 琳[1],李珉珉[2],赵 伟[1]
[1]南方医科大学药学院,广东 广州 510515;[2]暨南大学附属第一医院临床医学检验中心,广东 广州 510630

摘要:目的 研究狼毒大戟提取物对潜伏HIV激活的影响,探讨其激活潜伏HIV可能的机制以及清除HIV的作用。**方法** 取新鲜狼毒大戟植物根部组织,液氮速冻并粉碎成末,冷冻干燥3 d后称取少量,采用丙酮一步法提取并浓缩。以甲醇-水为流动相,采用HPLC反相C18柱分离,并通过MS鉴定后,得到狼毒大戟提取物(EFE)。以潜伏HIV细胞系J-Lat 10.6为激活模型,以TNF-α(10 ng/mL)作为阳性对照,EFE(50 μg/mL)处理24 h后,采用FACS分析GFP阳性率以观测激活活性。采用不同浓度NF-κB抑制剂(Bay 11-7082)抑制EFE活性,并用WB检测2 h内p65入核水平,以及24 h内HIV蛋白p24随时间点变化情况。**结果** 丙酮一步法可简便快速从狼毒大戟植物中提取得到EFE,经鉴定含prostratin及其类似物,分离后测得其中prostratin浓度为0.53 mmol/L。EFE(50 μg/mL)作用24 h可产生约50%激活潜伏HIV活性,同时HIV蛋白p24水平随时间显著增加。进一步研究发现NF-κB通路抑制剂(Bay 11-7082)可对EFE活性产生浓度依赖抑制作用,且2 h内胞核p65水平在EFE作用下增加明显。**结论** 狼毒大戟提取物EFE含有效成分prostratin及其类似物,可产生较强激活潜伏HIV活性,其机制为通过激活NF-κB通路促进p65入核从而发挥作用。

关键词:NF-κB;prostratin;潜伏HIV;狼毒大戟

Euphorbia fischeriana extract reactivates latent HIV through nuclear factor-κB pathway

PAN Xiaoyan[1], ZHANG Mingjiao[2], ZENG Xiaoyun[1], LIN Jian[1], LI Lin[1], LI MinMin[2], ZHAO Wei[1]
[1]School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Center for Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Euphorbia fischeriana* extract on latent HIV reactivation and the pathway involved in this process and discuss the value of *Euphorbia fischeriana* extract in eliminating HIV. **Methods** Fresh tissues of *Euphorbia fischeriana* root were crushed into powder after quick freezing with liquid nitrogen and extracted with acetone followed by a three-day vacuum freeze-drying for dehydration of the extract. The extract (EFE) was separated using RP-C18 column with high-performance liquid chromatography (HPLC) and identified with mass spectrometry (MS). The activity of reactivated latent HIV was analyzed by fluorescence-activated cell sorting in a J-Lat 10.6 cell model treated with EFE (50 μg/mL) for 24 h, using TNF-α (10 ng/mL) as the positive control. The effect of a NF-κB pathway inhibitor (Bay 11-7082) on EFE activity was tested. The changes in P65 expression in the cell nuclei within 2 h and HIV protein p24 expression within 24 h were analyzed by Western blotting in cells treated with EFE. **Results** EFE was obtained by one-step acetone extraction, and the concentration of prostratin in the extract was around 0.53 mmol/L. About 50% of the cells showed HIV reactivation after treatment with 50 μg/mL EFE for 24 h accompanied by a significantly increased p24 expression. The activity of EFE in reactivating latent HIV was inhibited by Bay 11-7082 in a concentration-dependent manner, and p65 accumulation was detected in the cell nuclei within 2 h. **Conclusion** EFE we obtained contains the active compounds of prostratin and its analogues and shows a strong capacity to reactivate latent HIV through classical NF-κB pathway.

Key words: nuclear factor-κB; prostratin; latent HIV; *Euphorbia fischeriana*

由HIV感染引发的艾滋病(AIDS)导致每年数百万人死亡。高效抗逆转录病毒疗法(HAART)应用于早期感染的患者,可有效抑制HIV感染,控制病毒血症,通过持续服药可有效延长感染者寿命[1]。然而患者一旦停止服药,HIV便再次活化并产生甚至更为严重的病毒血症[2]。研究发现HIV的潜伏感染是HAART根治HIV最大的障碍[3]。潜藏于机体静息期免疫细胞(如记忆性T细胞,纯真CD4+ T细胞,神经胶质细胞,星形胶质细胞等)中的HIV因无法被机体免疫细胞识别并清除,成为HIV难以治愈的根本原因[4]。"激活再杀灭(shock and kill)"策略提出的理念在于尝试采用小分子化合物与HAART联合使用从而达到彻底清除HIV的目的[5]。采用激活剂激活隐藏的HIV,从而使得机体的免疫细胞可特异性识别活化的细胞并

收稿日期:2015-05-01
基金项目:中国第54批博士后基金面上项目(1091013);暨南大学附属第一医院科研培育专项基金
作者简介:潘晓彦,在读博士研究生,电话:020-61648538,E-mail: xiaoyanpan1201@163.com;张明娇,在读硕士研究生,电话:020-38688431,E-mail: melody493587243@qq.com;潘晓彦、张明娇共同为第一作者
通信作者:李珉珉,主任技师,E-mail: limm269@126.com;赵 伟,副教授,E-mail: wei.zhao.csu@gmail.com

清除,同时采用HAART治疗,可杀灭释放出来的HIV颗粒防止其再次感染和复制。

目前,多种"激活再杀灭"联合用药模式正在临床试验当中[6]。寻找高效激活潜伏HIV小分子化合物成为当前亟待解决的问题,近年来研究发现植物来源的萜类化合物prostratin具有较强激活潜伏HIV作用[7]。中药材狼毒大戟具有治疗淋巴结结核,骨结核,皮肤结核,牛皮癣,神经性皮炎,慢性支气管炎,阴道滴虫等多种功效,在我国黑龙江、辽宁、内蒙古、河北等地均可生长,分布广泛,其提取物中的萜类化合物在抗肿瘤领域和潜伏HIV激活领域获得广泛关注[8-9]。本文通过改进的丙酮一步法高效提取了狼毒大戟萜类化合物,通过MS、HPLC分析鉴定该类化合物为prostratin及其类似物或衍生物,通过激活潜伏HIV细胞(J-Lat 10.6)实验,证明了该类化合物具有显著的潜伏HIV激活活性,并揭示其激活的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物,细胞与试剂 狼毒大戟植物购自辽宁葫芦岛,潜伏HIV细胞系J-Lat 10.6由复旦大学病原微生物研究所馈赠。澳洲胎牛血清及RMPI 1640培养基均购自美国Gibco,核蛋白抽提试剂盒购自美国Thermo Fisher Pierce,蛋白酶抑制剂混合物及磷酸酶抑制剂混合物购于美国Merk calbiochem。ECL发光液,p65兔mAb,p24,Lamin A/C鼠mAb以及羊抗兔和羊抗鼠二抗均购自美国CST,prostratin标准品购自美国SIGMA-Aldrich。提取用丙酮为分析纯,高效液相色谱仪流动相用甲醇为色谱纯。

1.1.2 仪器 药材粉碎机,超声仪,冷冻干燥机(Thermo SNL216V),高效液相色谱仪(岛津LC-10AT),质谱仪(WATERS 2695),台式低温离心机(Eppendorf 5810R)细胞培养箱(Thermo Forma Series II),荧光显微镜(Nikon Elipse Ti),流式细胞仪(BD FACS Canto II),电泳仪(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 狼毒大戟前处理及活性成分提取 采购的新鲜狼毒大戟根部,用刀切成块状,浇液氮迅速冷冻,并立刻置于药材粉碎机粉碎成末状。将狼毒大戟粉末置于冷冻干燥机,使之充分去除水分,3 d后取出,称重。将预干燥狼毒大戟干粉1 g溶于25 mL丙酮,混匀,100 HZ超声10 min,55 ℃水浴1 h。真空过滤,除去滤渣,获得丙酮溶解部分。真空旋转蒸发1.5 h左右,使丙酮挥发,浓缩至底部为黄褐色油状物为止,加入200 μL DMSO溶解,保存于−20 ℃待检测。

1.2.2 狼毒大戟提取物检测与分离 提取物经0.22 μm滤膜过滤后,上质谱分析,同时prostratin标准品用DMSO溶解作为对照。质谱鉴定提取物中的目标化合物后,采用HPLC分析,过C18柱,以甲醇/水为流动相,按照25%甲醇2 min,35%甲醇6 min,80%甲醇10 min的程序梯度洗脱,记录保留时间和峰高并收集目标单峰,同时以prostratin标准品作对照制作标准曲线,计算提取物中的活性化合物浓度。

1.2.3 潜伏HIV激活活性检测 J-Lat 10.6细胞用添加10%胎牛血清和1% 双抗的RPMI 1640培养基来进行培养,置于5% CO_2培养箱中,每隔3 d传代1次。取对数生长期J-Lat 10.6细胞,800 r/min离心5 min收集细胞,调整浓度为5×10^5个细胞/mL,0.5 mL培养液/孔均匀接种于48孔板中,以50 μg/mL EFE刺激细胞,未加药物组作为阴性对照,以10 ng/mL TNF-α做阳性对照。24 h后,置于荧光显微镜(放大倍数10×10)下,蓝光激发,并拍摄图片。随后,转移细胞培养液于流式管中,800 r/min离心5 min收集细胞,去除上清后,用500 μL PBS洗1次,将细胞重悬于300 μL PBS中,上流式细胞仪检测,计算GFP阳性比例。抑制实验分别以50 μg/mL EFE合用2.5、5、10 μmol/L的BAY 11-7082,同法操作。

1.2.4 激活NF-κB通路验证 J-Lat 10.6调整细胞浓度为2×10^6个细胞/mL,2 mL/孔接种于6孔板中,分别加50 μg/mL EFE刺激0.5、1 、2 h或添加相应浓度BAY 11-7082并以未加药组作为阴性对照。4 ℃,500 *g*离心5 min收集细胞于EP管中,在试剂盒细胞裂解液CER及NER中分别添加蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物,按照试剂盒操作步骤依次去除胞质并抽提核蛋白。或种板后分别在3、6、12、24 h加50 μg/mL EFE与添加相应浓度BAY 11-7082后提取总蛋白。蛋白定量后,加入上样缓冲液,将样品置于100 ℃加热5 min使蛋白变性。随后每孔上样20 μL(1 μg/μL)蛋白,经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳100 min分离,再将蛋白转印于PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭膜1 h后,p65,β-actin兔抗人单克隆抗体及p24、Lamin A/C鼠抗人单克隆抗体1∶1000稀释于5% 脱脂奶粉中,置于4 ℃摇床孵育过夜。第2天将膜取出,用PBS-T(含0.1% Tween 20)清洗3遍后与羊抗兔及羊抗鼠二抗室温共孵1 h,清洗5遍后用ECL发光液发光并显影。

1.2.5 数据分析 流式数据分析均采用FlowJo 7.6分析软件来进行处理,GFP百分率采用prism 5作图软件作图,误差线均用均数±标准差来表示。荧光图片及WB图片运用adobe photoshop CS5处理。WB条带灰度值采用ImageJ2X软件来分析。

2 结果

2.1 狼毒大戟提取物中活性组分质谱鉴定和高效液相色谱分析

根据化合物prostratin结构(图1)分析,采用丙酮一

步法从狼毒大戟粉末中提取得到的样品浓缩后溶于DMSO,通过质谱检测,以标准品prostratin作为对照,鉴定出粗提物中含有prostratin及prostratin类似物。采用ESI(+)-MS,检测到M+23(Na)离子峰,质谱结果(图2)如下。

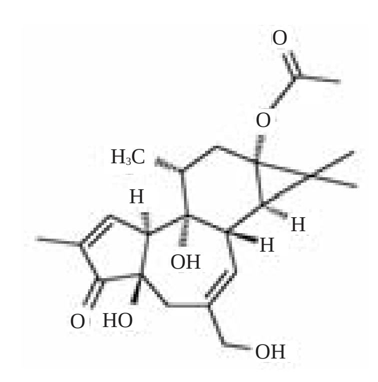


图1 Prostratin的化学结构(相对分子质量390.47)

Fig.1 Cchemical structure of prostratin, C22H30O6 , M.W. 390.47.

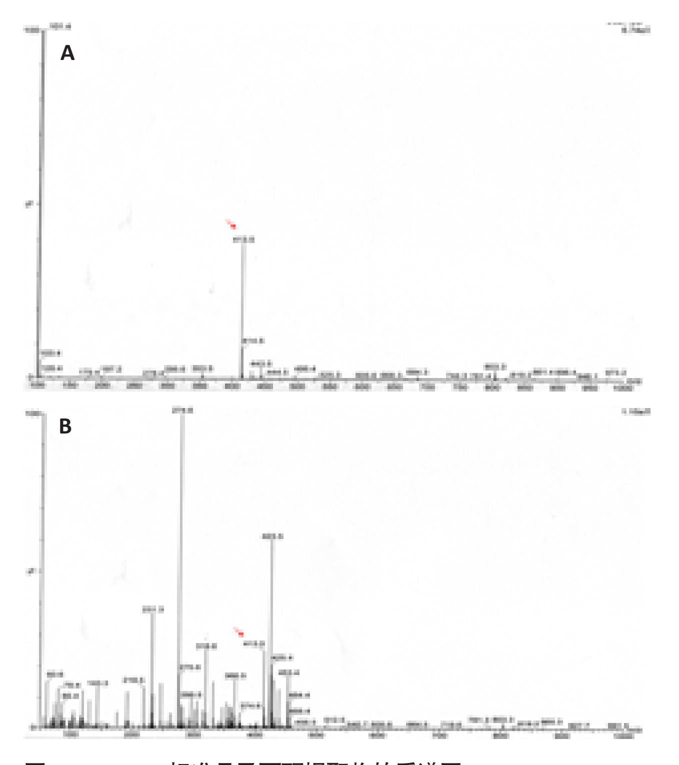


图2 Prostratin标准品及丙酮提取物的质谱图

Fig.2 Mass spectrogram of prostratin standard control (*A*) and acetone extract of *Euphorbia fischeriana* (*B*).

丙酮提取物过C18反相柱高效液相色谱仪,用甲醇作流动相来进行梯度洗脱,以prostratin标准品作对照,记录保留时间及峰面积。以0、0.025、0.5、0.1、0.2 mmol/L prostratin标准品做标准曲线(R^2=0.99)。通过标准曲线计算,得到丙酮提取物中活性组分prostratin浓度约为0.53 mmol/L。

2.2 狼毒大戟提取物对潜伏HIV的有效激活

J-Lat 10.6是一株HIV潜伏细胞系,多用于激活化合物的筛选,插入HIV基因组中的GFP基因随HIV基因组整合于细胞中并处于潜伏状态,药物作用后GFP的表达水平即代表HIV的激活水平。用50 μg/mL EFE刺激24 h后,在荧光显微镜下观察并拍照,结果如图(图3)所示。对应流式检测结果如图4。结果显示在药物作用下,GFP水平明显上调,说明EFE能显著激活潜伏HIV。

2.3 狼毒大戟提取物通过提高激活NF-κB通路激活潜伏HIV

EFE刺激潜伏细胞的同时,采用2.5、5、10 μmol/L BAY 11-7082处理细胞24 h后,检测GFP阳性率,抑制结果如图5所示。结果显示BAY 11-7082呈浓度依赖方式抑制EFE激活潜伏HIV的作用,间接证明EFE激活潜伏HIV受到NF-κB通路调控。药物处理不同时间点提取核蛋白或总蛋白,用WB检测,蛋白印迹图片(图6)显示随着时间变化,p65核内水平显著上调,且HIV蛋白p24随着药物作用时间明显增加。为进一步确定EFE通过NF-κB 通路激活潜伏HIV,采用NF-κB 通路特异性抑制剂BAY 11-7082与EFE共同作用后(图7),发现其能够抑制EFE诱导的p65入核,同时抑制了p24的生成。

3 讨论

研究结果表明,药用植物狼毒大戟根部含有大量prostratin,采用丙酮一步法可高效提取,研究中采用MS鉴定并通过HPLC测得含量。实验结果证明prostratin能有效激活潜伏HIV,进一步探讨其激活潜伏HIV机制,发现其可通过激活NF-κB,诱导p65入核与DNA结合从而发挥转录激活作用。

狼毒大戟作为传统中药材,其适应病症与功效早有记载,因其毒性多作外用。在深入研究其活性组分的进程中[9],通过分离提取得到了多种萜类化合物:prostratin, phorbol, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), Phorbol 12,13,20-triacetate等。其中prostratin作为酪氨酸激酶抑制剂在抗肿瘤方面发挥重要疗效,近年来,又发现其有强烈的激活潜伏HIV的作用,具有良好的清除潜伏HIV实现HIV功能性治愈的前景[10]。随着各研究领域对prostratin的关注增多,研究人员也不再局限于从植物中提取,以phorbol为原料的半合成方法以及生物合成方法取得了突破性进展[11-12]。然而,因其合成产率低以及合成难度大,依然不能改变prostratin价格昂贵的现状。本文中采用改进的丙酮一步法,可获得约40 μg/1 g干重的高产率,在提取方法上与传统方法按化合物极性分步提取的方法相比较,具有快速,简便的优势,避免了多次分步提取导致的活性组分损失,同时也节约了大量

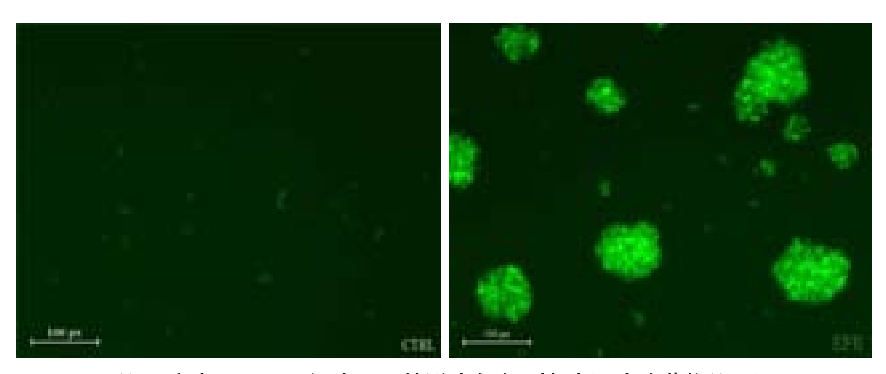
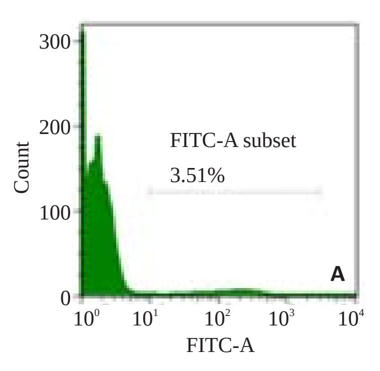
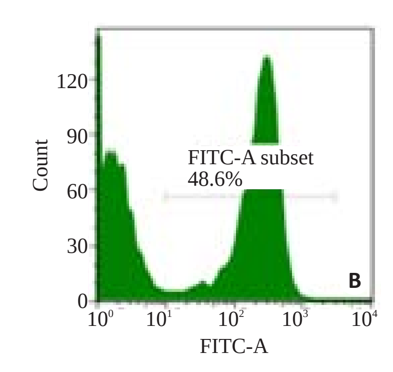


图3 EFE处理后对J-Lat 10.6细胞GFP的影响左为阴性对照,右为药物处理组

Fig.3 Fluorescent images of GFP cells. The left is negative control; the right is J-Lat 10.6 cells treated with EFE.





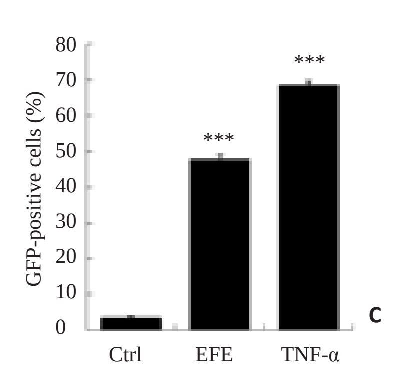


图4 EFE对潜伏HIV的激活效果

Fig.4 Activity of EFE in reactivating latent HIV. *A*, *B*: Flow cytometry analysis of GFP subset; *C*: Statistics of GFP %. ***$P<0.01$ *vs* control Group.

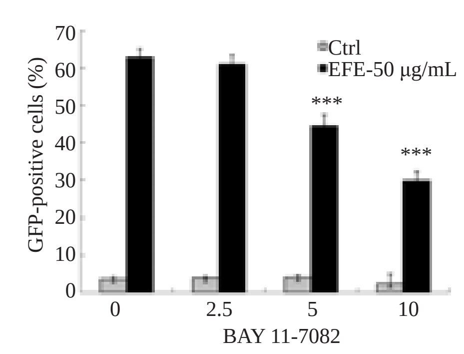


图5 BAY 11-7082对EFE激活潜伏HIV在24 h产生的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effect of BAY 11-7082 on EFE shown by GFP% reduction. ***$P<0.01$ *vs* control Group.

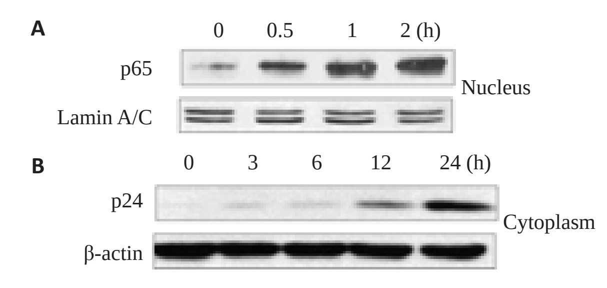


图6 EFE对HIV蛋白和NF-κB通路的影响

Fig.6 Effect of EFE on p24 and NF-κB pathway. *A*: Nucleus protein level of p65 increased over time; *B*: HIV protein p24 increased apparently in 24 h.

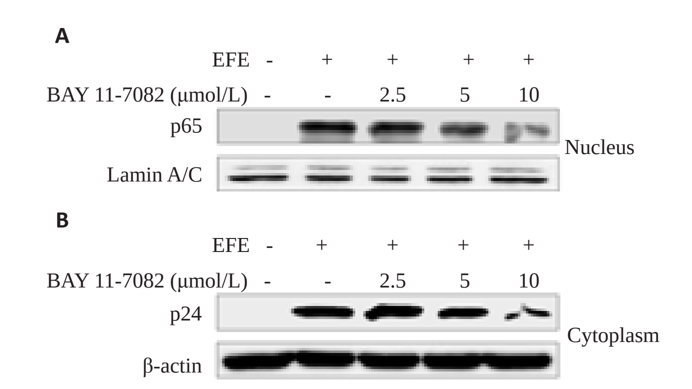


图7 BAY 11-7082对EFE激活的抑制作用

Fig.7 Effect of BAY 11-7082 on HIV reactivation capacity of EFE. *A*: Nuclear accumulation of p65 was inhibited by BAY 11-7082; *B*: The expression of p24 mediated by EFE was inhibited by BAY 11-7082.

时间和精力,充分体现了丙酮一步法的优势,不失为prostratin提取分离的优良方法[13]。

目前,关于HIV潜伏的机制并不十分明晰,总结已发现激活剂的激活途径,可主要分为以下四类:以prostratin为代表的PKC通路激活剂;以vorinostat为代表的HDAC抑制剂;以JQ1为代表的P-TEFb激活剂;以及以IL-7为代表的免疫功能调节剂[14]。而后续深入研究发现PKC通路下游入核转录效应因子NF-κB在四类

激活剂的激活效应中均发挥作用,成为HIV基因转录的关键因子[15]。经典NF-κB通路在介导炎症,免疫反应,肿瘤生长和抑制方面得到了深入研究,其在药物诱导作用下通过多种通路活化并入核与DNA相结合,发挥启动转录特异基因的作用[16]。文中采用提取的EFE作用于潜伏HIV细胞系J-Lat 10.6,发现其激活机制为促进p65入核从而发挥转录激活效应,充分论证了NF-κB通路在潜伏HIV激活过程中的关键作用。而在最新的研究中发现,非经典NF-κB通路在HIV的转录激活过程中同样发挥了非常关键的作用[17-18]。

总之,传统中药材狼毒大戟根部提取组分具有良好的激活潜伏HIV活性,其药用价值和提取分离方法值得进行深入探究。NF-κB通路在炎症肿瘤等多种疾病的发生和发展中发挥了至关重要的作用,在潜伏HIV转录激活的过程中的作用仍然值得进一步探索。本文研究为解决prostratin的来源问题提供一定的可行性,并为激活潜伏HIV机制以及HIV的清除提供了理论基础。

参考文献:

[1] Shan L, Siliciano RF. From reactivation of latent HIV-1 to elimination of the latent reservoir: the presence of multiple barriers to viral eradication[J]. Bioessays, 2013, 35(6): 544-52.

[2] Le T, Farrar J, Shikuma C. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication[J]. AIDS, 2011, 25(6): 871-2; author reply 872-3.

[3] Tyagi M, Bukrinsky M. Human immunodeficiency virus (HIV) latency: the major hurdle in HIV eradication[J]. Mol Med, 2012, 18(1): 1096-108.

[4] Katlama C, Deeks SG, Autran B, et al. Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs[J]. Lancet (London, England), 2013, 381(9883): 2109-17.

[5] Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir[J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(1): 29-35.

[6] Rasmussen TA, Tolstrup M, Winckelmann A, et al. Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies: advancing to clinical trials[J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(4): 790-9.

[7] Williams SA, Chen LF, Kwon H, et al. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB[J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 42008-17.

[8] Tang Y, Jiang W, Wu Q, et al. Comparative characteristic of the inflammatory diterpenes in the Roots of Euphorbia fischeriana with different preparation method using HPLC-ELSD[J]. Fitoterapia, 2012, 83(3): 427-33.

[9] 王金兰, 王玉起, 李 涛, 等. 新鲜狼毒大戟根化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1406-9.

[10] Cox PA, Johnson HE, Tavana G. Giving samoan healers credit for prostratin[J]. Science, 2008, 320(5883): 1589.

[11] Barrero RA, Chapman B, Yang Y, et al. De novo assembly of Euphorbia fischeriana root transcriptome identifies prostratin pathway related genes[J]. BMC Genomics, 2011, 12(5): 600.

[12] Dechristopher BA, Loy BA, Marsden MD, et al. Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs *in vitro*[J]. Nat Chem, 2012, 4(9): 705-10.

[13] Tang Q, Su ZH, Han ZT, et al. LC-MS method for detecting prostratin in plant extracts and identification of a high-yielding population of Euphorbia fischeriana[J]. Phytochem Lett, 2012, 5(1): 214-8.

[14] Van Der Sluis RM. Jeeninga R E,berkhout B.establishment and molecular mechanisms of HIV-1 latency in T cells[J]. Curr Opin Virol, 2013, 3(6): 700-6.

[15] Chan JK, Greene WC. NF-κB/Rel: agonist and antagonist roles in HIV-1 latency[J]. Curr Opin HIV AIDS, 2011, 6(1): 12-8.

[16] Setia S, Sanyal SN. Nuclear factor kappa B: a pro-inflammatory, transcription factor-mediated signalling pathway in lung carcinogenesis and its inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2012, 31(1): 27-37.

[17] Liu R, Tan J, Lin Y, et al. HIV-1 Vpr activates both canonical and noncanonical NF-κB pathway by enhancing the phosphorylation of IKKα/β[J]. Virology, 2013, 439(1): 47-56.

[18] Manches O, Fernandez MV, Plumas J, et al. Activation of the noncanonical NF-κB pathway by HIV controls a dendritic cell immunoregulatory phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(35): 14122-7.

(编辑:孙昌朋)